

Ispitivanje olopatadin-hidrohlorida pod stres uslovima metodom tečne hromatografije hidrofilnih interakcija

Jelena Đ. Maksić¹, Anja R. Tumpa², Igor B. Popović³, Biljana S. Jančić-Stojanović²

¹Vojnomedicinska akademija, Sektor za farmaciju, Odeljenje za ispitivanje i kontrolu lekova, Beograd, Srbija

²Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za analitiku lekova, Beograd, Srbija

³Agencija za lekove i medicinska sredstva, Beograd, Srbija

Izvod

U savremenoj farmaceutske analizi neke farmaceutski aktivne supstance studije forsirane degradacije imaju veliki značaj jer se iz njih može dobiti veliki broj značajnih podataka o stabilnosti leka. U ovom radu, opisano je ispitivanje stabilnosti olopatadin-hidrohlorida pod uticajem stres agenasa a u cilju dobijanja podataka o njegovoj stabilnosti. Za praćenje ponašanja olopatadin-hidrohlorida primenjena je metoda tečne hromatografije hidrofilnih interakcija (eng. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography – HILIC). Olopatadin-hidrohlorid izložen je dejstvu kiseline, baze, povišene temperature i oksidacionog sredstva, a stepen degradacije praćen je u definisanim vremenskim intervalima. Takođe, određena je i kinetika degradacije u cilju sticanja boljeg uvida u stabilnost supstance i njen mehanizam razgradnje. Definisani su red reakcije, konstanta brzine reakcije i poluvreme degradacije nakon izlaganja dejstvu kiseline, baze i oksidacionog sredstva.

Ključne reči: olopatadin-hidrohlorid; studije forsirane degradacije; kinetika degradacije; tečna hromatografija hidrofilnih interakcija.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

NAUČNI RAD

UDK 615.07:543.544.5

Hem. Ind. 70 (3) 339–346 (2016)

doi: 10.2298/HEMIND150404039M

Studije forsirane degradacije ili stres studije sprovode se u cilju ispitivanja osnovne hemijske stabilnosti aktivne farmaceutske supstance i farmaceutskog doziranog oblika [1]. Ove studije izvode se pod uslovima koji su drastičniji od uslova propisanih za ubrzane studije stabilnosti (temperatura 40 °C, relativna vlažnost 75%). Na osnovu studija forsirane degradacije dobijaju se informacije o mogućim degradacionim putevima i mehanizmu degradacije aktivne supstance u kratkom vremenskom intervalu, kao i o predloženom degradacionom profilu [2]. Takođe, omogućavaju identifikaciju i karakterizaciju degradacionih proizvoda koji se sponzantano mogu javiti tokom sinteze, proizvodnje, upotrebe i čuvanja leka [3]. Nastali proizvod može biti srodna supstanca aktivnoj supstanci ili ekscipijensima, ili može nastati kao rezultat interakcije između aktivne supstance ili ekscipijenasu.

Osnovni cilj studija forsirane degradacije je dobijanje uzoraka koji sadrže degradacione proizvode u koncentraciji od 5 do 20% [4]. Degradacija ispod 5% ne uzima se u razmatranje, jer se smatra da veoma male količine degradacionih proizvoda nastalih pod stres uslovima, ne bi nastale pod preporučenim uslovima čuvanja aktivne supstance ili gotovog proizvoda. S druge strane, degradacija preko 20% ne dovodi do

pouzdanog definisanja degradacionog profila. Takođe, korisne su i za potvrdu specifičnosti metode tokom razvoja, optimizacije i validacije analitičkih metoda za praćenje stabilnosti (eng. Stability Indicating Method) [5–8].

Uprkos značaju studija forsirane degradacije u svim fazama farmaceutskog razvoja, važeće smernice koje se odnose na ove studije veoma su uopštene. U Q1A (R2) smernici Međunarodne konferencije za harmonizaciju (eng. International Conference on Harmonisation – ICH), navodi se da se studije sprovode na jednoj seriji lekovite supstance ili gotovog proizvoda, u čvrstom obliku, odnosno, u obliku rastvora ili suspenzije. Preporuka je da se izvode pod sledećim uslovima: povišena temperatura (za oko 10 °C viša od temperature kod ubrzanih studija stabilnosti, tj. 50 °C, odnosno 60 °C), povećana relativna vlažnost (75% i više), hidroliza u širokom opsegu pH vrednosti, fotoliza i oksidacija [9]. Studije fotostabilnosti integralni su deo stres testova i detaljno su opisane u ICH Q1B smernici. Fotoliza se izvodi izlaganjem leka kombinaciji bele svetlosti, UV i fluorescentnih lampi ili korišćenjem halogenih ili ksenon lampi [10]. Međutim, pomenute smernice ne obezbeđuju dovoljno informacija o strategiji i principima sprovođenja stres testova, odnosno, ne specificiraju opseg pH vrednosti, kao ni temperaturni opseg i specifična oksidaciona sredstva [11].

Cilj ovog rada je izvođenje studija forsirane degradacije na olopatadin-hidrohloridu i praćenje nastalih proizvoda degradacije metodom tečne hromatografije hidrofilnih interakcija (eng. Hydrophilic Interaction

Prepiska: B.S. Jančić-Stojanović, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za analitiku lekova, Vojvode Stepe 450, Beograd, Srbija.

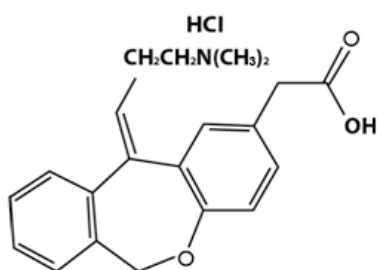
E-pošta: jancic.stojanovic@pharmacy.bg.ac.rs

Rad primljen: 4. april, 2015

Rad prihvaćen: 9. jul, 2015

Liquid Chromatography – HILIC) opisanom u radu [12]. Pored toga, cilj je bio i određivanje kinetika degradacije kako bi se izračunale odgovarajuće konstante brzine i poluvremena razgradnje u kiseloj, baznoj sredini, kao i nakon izlaganja oksidacionom sredstvu. Tumačenje parametara kinetike reakcije degradacije olakšava razumevanje mehanizma degradacije i sticanje boljeg uvida u stabilnost ispitivane supstance [13,14].

Olopatadin-hidrohlorid ((11Z)-11-(3-(dimetilamino)propiliden)-6,11-dihidrodibenzo[*b,e*]oksepin-2-il)sirćetna kiselina-hidrohlorid je antialergijski lek sa bifaznim dejstvom (selektivni inhibitor histaminskih H_1 receptora i stabilizator mastocita), koji se koristi u terapiji alergijskog konjuktivitisa [15]. Struktura analiziranog jedinjenja prikazana je na slici 1.



Slika 1. Hemijska struktura analizirane supstance.
Figure 1. Chemical structure of the analyzed substance.

Olopatadin-hidrohlorid je oficinalan u USP/NF farmakopeji, koja za određivanje aktivne farmaceutske supstance i srodnih supstanci propisuje metodu reversno-fazne tečne hromatografije (eng. Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography – RP-HPLC) [16].

Olopatadine *in bulk* i u kapima za oči određivan je UV–Vis spektroskopskom metodom (eng. Ultraviolet-Visible Spectroscopy) [17] ili jon-par HPLC metodom [18]. Dalje, derivativna spektroskopska metoda opisana je za određivanje supstance u farmaceutskim doziranim oblicima [19]. U tabletama, određivanje je vršeno izokratskom RP-HPLC i HPTLC metodom (eng. High Performance Thin Layer Chromatography) [20,21]. Kvantitativna analiza aktivne supstance u formulaciji i studije forsirane degradacije izvedene su i primenom RP-HPLC metode za praćenje stabilnosti [22]. Identifikacija i karakterizacija četiri degradaciona proizvoda ((11E)-11-(3-(dimetilamino)propiliden)-6,11-dihidrodibenz[*b,e*]oksepin-2-il)sirćetna kiselina, ((9Z)-9-(3-(dimetilamino)propiliden)-9H-fluoren-7-il)sirćetna kiselina metil-((11Z)-11-(3-(dimetilamino)propiliden)-6,11-dihidrodibenz[*b,e*]oksepin-2-il)acetat i metil-((11E)-11-(3-(dimetilamino)propiliden)-6,11-dihidrodibenz[*b,e*]oksepin-2-il)acetat dobijena pod *stres* uslovima postignuta je LC-MS/TOF (eng. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/ Time-of-Flight) tehnikom [23]. *N*-oksid, kao

proizvod termalne i oksidativne degradacije, identifikovan je UHPLC metodom (eng. Ultra High Performance Liquid Chromatography) nakon sterilizacije kapi za oči toplotom i filtracijom [24]. U humano plazmi određivanje koncentracije leka i njegovih metabolita vršeno je LC metodom sa masenom detekcijom [25,26].

Pregled literature pokazao je da stabilnost olopatadin-hidrohlorida nije još uvek dovoljno proučena, kao i da u dosadašnjoj literaturi nije opisana primena HILIC metode za praćenje stepena degradacije ispitivanog jedinjenja pod *stres* uslovima.

EKSPERIMENTALNI DEO

Hromatografski uslovi

Eksperimenti su izvedeni na hromatografskom sistemu Waters Breeze, koji se sastoji od Waters 1525 binarne HPLC pumpe, Waters 2487 UV/Vis DAD detektora i Breeze Software Windows XP za prikupljanje i obradu podataka. Hromatografska analiza urađena je na Betasil Cyano (100 mm×4,6 mm, 5 μ m veličine čestica) koloni, sa mobilnom fazom koja se sastoji od acetonitrila i vodenog rastvora amonijum-acetata 5 mM (čija je pH vrednost podešena na 4,50 glacialnom sirćetnom kiselinom), u odnosu 85:15 V/V. Pripremljena mobilna faza je deaerizovana i profiltrirana kroz membranski filter Alltec (Loceren, Belgium), veličine pora 0,45 μ m. Temperatura kolone podešena je na 30 °C, a brzina protoka mobilne faze na 1 mL min⁻¹. Volumen injektovanja bio je 20 μ L, a talasna dužina detekcije 257 nm [12].

Reagensi

Za pripremu mobilne faze i rastvora korišćeni su reagensi HPLC čistoće: acetonitril (SIGMA, St. Louis, MO, USA), amonijum-acetat (J.T. Baker, Holandija), glacialna sirćetna kiselina (Zorka Pharma, Srbija) i voda HPLC kvaliteta (Simplicity 185 sistem, Milipore, Nemačka).

Priprema rastvora za izvođenje studija forsirane degradacije

Za hromatografsku analizu korišćen je radni standard olopatadin-hidrohlorida (Enaltec Labs, Indija). Osnovni rastvor ($c = 1 \text{ mg mL}^{-1}$) pripremljen je u mobilnoj fazi navedenoj kod eksperimentalnih uslova. Radni rastvori ($c = 100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) pripremljeni su razblaživanjem odgovarajućim *stres* agensima. Kao *stres* agensi korišćeni su 0,5 i 1 M natrijum-hidroksid, 0,5, 0,1 i 0,01 M hlorovodonična kiselina, kao i 3, 15 i 30% rastvori vodonik-peroksida.

Degradacija na povišenoj temperaturi praćena je zagrevanjem vodenog rastvora na temperaturi od 60 °C. Neposredno nakon dodatka *stres* agenasa, odnosno u nultom minutu pod opisanim hromatografskim uslovima radjena je analiza. Degradacija svih uzoraka pra-

ćena je u definisanim vremenskim intervalima a koncentracija olopatadin-hidrohlorida nakon izlaganja stres agensima određenja je poređenjem sa rastvorom standarda olopatadin-hidrohlorida koncentracije $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

REZULTATI I DISKUSIJA

U ovom radu opisano je ispitivanje stabilnosti olopatadin-hidrohlorida nakon izlaganja rastvora aktivne supstance stres agensima prema propisu ICH Q1 (R2) smernice [9]. Olopatadin-hidrohlid tretiran je različitim stres agensima, kao što su kiselina, baza, oksidaciono sredstvo i povišena temperatura. Stepenn degradacije pod uticajem različitih stres agenasa praćen je HILIC metodom [12].

HILIC metoda predstavlja alternativni tip tečne hromatografije pod visokim pritiskom koja primenjuje polarne stacionarne faze (kolone od čiste silike i hemijski modifikovane derivatizovane silika kolone), kao i mobilne faze sa visokim procentom organskom rastvarača (najčešće acetonitril u koncentraciji > 70%) i malim udelom polarnog rastvarača (>2,5%) [27]. Vodena faza uglavnom uključuje dodatak pufera, pre svega amonijum-acetata i amonijum-formijata, koji smanjuju elektrostatičku interakciju između naelektrisanog analita i deprotonovanih silanolnih grupa na površini stacionarne faze. HILIC se smatra tehnikom izbora za analizu nenaelektrisanih visoko polarnih hidrofilnih i amfifilnih supstanci, kao i baznih lekova, ugljenih hidrata i brojnih naelektrisanih i neutralnih supstanci [28]. Mehanizmi razdvajanja u HILIC su veoma kompleksni i podrazumevaju kombinaciju particije i adsorpcije analita, kao i jonske interakcije analita sa negativno naelektrisanim silanilnim grupama [29]. Kako je ponašanje olopatadin-hidrohlorida u HILIC-u opisano u referenci [12], očekivano je da se u posmatranom sistemu mogu pratiti degradacioni proizvodi različite polarnosti i time dobiti novi podaci o stabilnosti olopatadin-hidrohlorida. U ovom istraživanju, olopatadin-hidrohlid najpre je tretiran bazom, odnosno 0,5 i 1 M NaOH. Tokom 72 sata tretiranje olopatadin-hidrohlorida sa 0,5 M NaOH nije dovelo do značajne degradacije. Dodatak jače baze, 1 M NaOH, nije uticao je na povećanje degradacije. Dobijeni rezultati pokazuju da se olopatadin-hidrohlid u nultom minutu razgradio 2,07%, nakon 24 h 2,72%, nakon 48 h 3,55% u odnosu početnu koncentraciju. Smatra se

da degradacija manja od 5% nije reprezentativna i da ovi degradacioni proizvodi neće nastati u redovnim studijama stabilnosti pri preporučenim uslovima čuvanja [4]. Može se zaključiti da olopatadin-hidrohlid stabilan u baznoj sredini.

U sledećoj fazi ispitan je uticaj povećanja temperature na stabilnost olopatadin-hidrohlorida. Zagrevanjem vodenog rastvora na 60°C pokazano je da ne dolazi do razgradnje pod dejstvom povišene temperature, odnosno da je ispitivana supstanca termostabilna. U definisanim vremenskim intervalima (0 h, 15 min, 1, 2 i 3 h), nije došlo do promene, odnosno, smanjenja koncentracija analita.

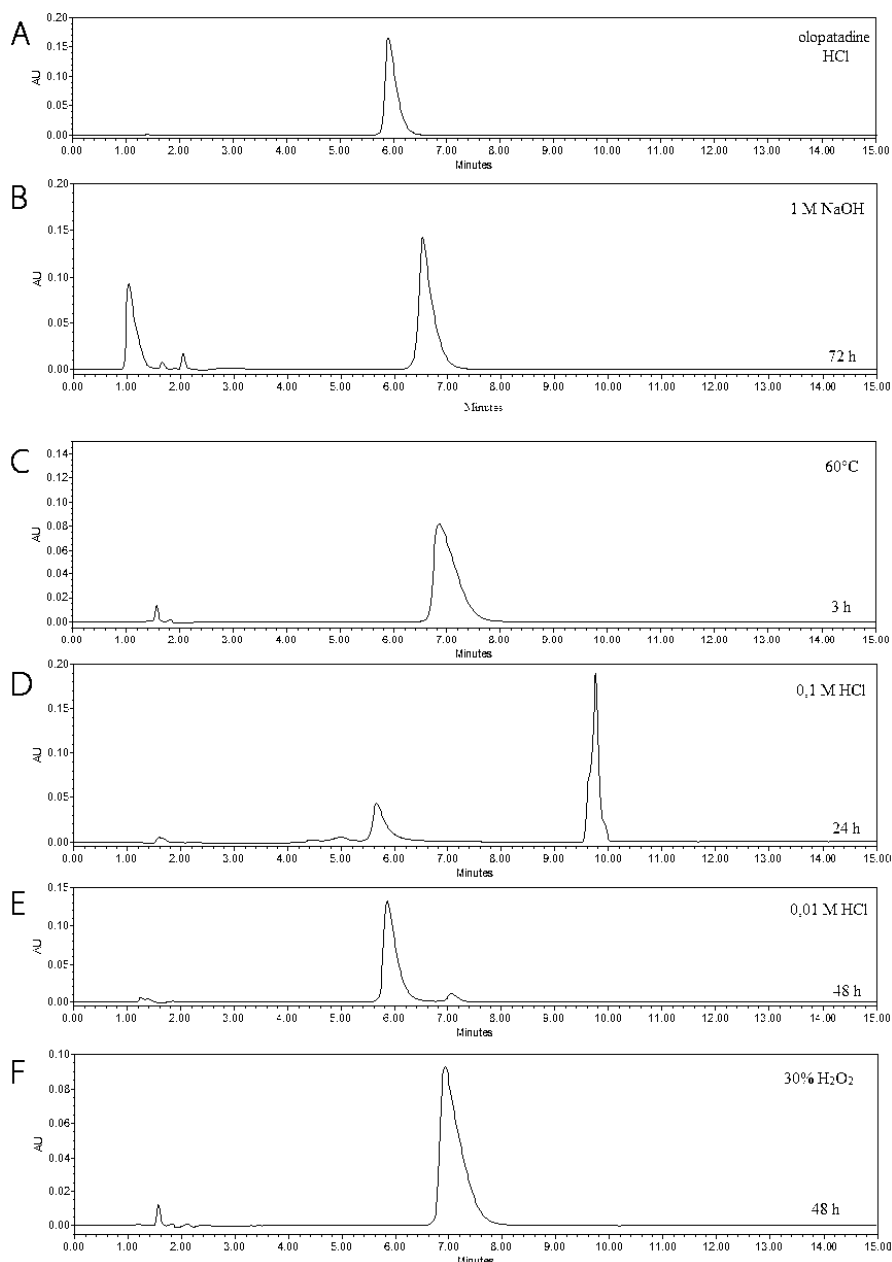
Hidroliza u kiselj sredini sa 0,5 M HCl pokazala je potpunu degradaciju u nultom minutu, pa je analiza ponovljena sa manjim koncentracijama ove kiseline. Tretiranje sa slabijom 0,1 M HCl dovelo je do značajnog smanjenja koncentracije analita, te se može pretpostaviti izrazita nestabilnost analita u kiselj sredini. Koncentracija se trenutno smanjila za 34%, nakon 15 min za 39%, 1 h za 46,6%, a nakon 2 h za 48,3%. Nakon 24 h procenat degradacije bio je 61,3% u odnosu na inicijalnu koncentraciju. Tretiranje sa slabijom kiselinom, 0,01 M HCl, dovelo je do reprezentativne i manje intenzivne degradacije ispitivanog analita. U definisanim vremenskim intervalima (0 h, 15 min, 1 i 2 h) smanjenje koncentracije olopatadin-hidrohlorida bilo je manje od 10% u odnosu na inicijalnu koncentraciju. Nakon 24 i 48 h procenat degradacije nije se značajno povećavao.

Dodatkom oksidacionog sredstva H_2O_2 u nižim koncentracijama (3 i 15%), olopatadin-hidrohlid je ostao relativno stabilan. Međutim, veća koncentracija vodonik-peroksida od 30% dovela je do intenzivnije degradacije. Supstanca se u nultom minutu razgradila 0,76%, nakon 1 h nije došlo do značajne razgradnje, ali nakon 48 h procenat razgradnje bio je 7,55. Prikaz rezultata studija forsirane degradacije dat je u tabeli 1.

Rezultati stres studija pokazuju da je olopatadin-hidrohlid stabilan u baznoj sredini, kao i pod dejstvom povišene temperature (60°C). S druge strane, hidroliza u kiselj sredini i oksidacija u prisustvu visoke koncentracije vodonik peroksida ukazuju na relativnu nestabilnost supstance u prisustvu pomenutih stres agenasa. Odabrani hromatogrami olopatadin-hidrohlida dobijeni nakon izlaganja različitim stres agensima prikazani su na slici 2.

Tabela 1. Pregled rezultata studija forsirane degradacije (stepenn degradacije, %)
Table 1. Summary of results of stress degradation studies (degradation degree, %)

Agens	Vreme degradacije, h						
	0	0,25	1	2	3	24	48
1 M NaOH	2,07	2,26	2,49	2,65	–	2,72	3,55
0,1 M HCl	34,0	39,0	46,6	48,3	–	61,3	–
0,01 M HCl	4,97	6,34	7,22	9,50	–	10,16	10,23
30% H_2O_2	0,76	1,39	3,08	5,07	5,41	5,52	7,55



Slika 2. Odabrani hromatogrami olopatadin-hidrohlorida dobijeni nakon izlaganja različitim stres agensima; A. Hromatogram standarda olopatadin-hidrohlorida ($c = 100 \mu\text{g mL}^{-1}$); B. Hromatogram uzorka nakon tretiranja olopatadin-hidrohlorida sa 1 M NaOH; C. Hromatogram uzorka nakon zagrevanja vodenog rastvora olopatadin-hidrohlorida na 60°C ; D. Hromatogram uzorka nakon tretiranja olopatadin-hidrohlorida sa 0,1 M HCl; E. Hromatogram uzorka nakon tretiranja olopatadin-hidrohlorida sa 0,01 M HCl; F. Hromatogram uzorka nakon tretiranja olopatadin-hidrohlorida sa 30% H_2O_2 .

Figure 2. Selected chromatograms of the olopatadine HCl after exposure to a different stress agents; A. Chromatogram of olopatadine HCl standard ($c = 100 \mu\text{g mL}^{-1}$); B. Chromatogram of the sample after treatment olopatadine HCl with 1 M NaOH; C. Chromatogram of the sample after heating an aqueous solution olopatadine HCl at 60°C ; D. Chromatogram of the sample after treatment olopatadine hydrochloride with 0,1 M HCl; E. Chromatogram of the sample after treatment olopatadine hydrochloride with 0,01 M HCl; F. Chromatogram of the sample after treatment olopatadine hydrochloride with 30% H_2O_2 .

Na osnovu priloženih hromatograma može se zaključiti da je HILIC metoda uspešno primenjena za praćenje stabilnosti olopatadin-hidrohlorida pod uticajem različitih stres agenasa. Takođe, može se zaključiti da se pod uticajem 0,1 M HCl (slika 2D) dobija degradacioni proizvod (retenciono vreme ≈ 10 min) koji ne nastaje

pod ostalim stres uslovima. Pozicija pika na hromatogramu (eluiranje nakon olopatadin-hidrohlorida) ukazuje da je degradacioni proizvod veće polarosti jer u HILIC povećanje polarnosti dovodi do dužeg zadržavanja analita u koloni.

Naime, u sistemu reverznih faza kada je analit veće polarnosti kraće se zadržava u koloni i eluira se ranije što u zavisnosti od prirode analita može voditi neretencijom ponašanja čime se značajno otežava identifikovanje novog pika. Upravo u ovome se i ogleda prednost primenjene HILIC metode jer zbog različitih mehanizama u odnosu na najčešće primenjivani reverzno-fazni sistem omogućava kasnije eluiranje polarnih struktura te se nedvosmisleno može ukazati na postojanje novog entiteta u hromatografskom sistemu što je od posebnog značaja u izvođenju stres studija.

U nastavku istraživanja određena je kinetika reakcije degradacije kako bi se doneo konačan zaključak o ponašanju i degradacionom profilu olopatadin-hidrohlorida. Cilj je bio razumevanje mehanizma degradacije, kao i predviđanje brzine reakcije degradacije i poluvremena degradacije. Tok reakcija degradacije zavisi od rastvarača, koncentracije reaktanata, temperature i pH vrednosti. Red reakcije opisuje zavisnost brzine reakcije od koncentracije reaktanata. Lekovite supstance uglavnom se razlažu po principu reakcija nultog, prvog ili pseudo-prvog reda. Međutim, mogu biti zastupljeni i složeniji mehanizmi degradacije, odnosno reakcije višeg reda [30]. Brzina reakcije određuje se na osnovu brzine smanjenja koncentracije reaktanata ili brzine porasta koncentracije proizvoda reakcije. Za opisivanje reakcija koristi se zakon brzine reakcije, koji može imati diferencijalni i integralni oblik što je opisano u literaturi [14,30], a način određivanja reda reakcije dat je u radovima [31,32]. Kao konačan podatak izračunava se konstanta brzine reakcije [33–35].

U ovom radu, kinetika degradacije olopatadin-hidrohlorida određena je u kiseloj i baznoj sredini, kao i nakon izlaganja oksidacionom sredstvu. Definisani vremenski intervali i dobijeni rezultati prikazani su u tabelama od 2 do 5.

Tabela 2. Kinetika degradacije olopatadin-hidrohlorida nakon izlaganja 1 M NaOH

Table 2. Degradation kinetics of the olopatadine hydrochloride degradation after exposure to a 1 M NaOH

Vreme, h	c / mM	ln c	1/c
0	0,289141	–1,24084	3,458520
0,25	0,281805	–1,26654	3,548553
1	0,289836	–1,23844	3,450227
3	0,286052	–1,25158	3,495868
24	0,281232	–1,26857	3,555783
48	0,278904	–1,27689	3,585463
Koeficijent korelacije (r)	0,763281	0,7656	0,7680

Na osnovu najviših vrednosti koeficijenata korelacije, pokazano je da su kisela, bazna i oksidativna degradacija reakcije drugog reda.

Iako promena koncentracije sa vremenom pruža detaljan opis brzine reakcije, poželjno je definisati i jed-

nostavnu meru brzine reakcije, odnosno poluvreme reakcije. Poluvreme reakcije predstavlja ono vreme za koje se početna koncentracija reagujuće supstance smanji na polovinu, i što je reakcija brža, poluvreme reakcije je kraće [30]. Za reakciju prvog reda poluvreme reakcije ne zavisi od koncentracije, dok je za reakciju drugog reda obrnuto proporcionalno početnoj koncentraciji reaktanta. Vrednosti konstanti brzina degradacije i poluvremena reakcija, izračunatih na osnovu prikazanih jednačina, predstavljeni su u tabeli 6.

Tabela 3. Kinetika degradacije olopatadin-hidrohlorida nakon izlaganja 0,1 M HCl

Table 3. Degradation kinetics of the olopatadine hydrochloride degradation after exposure to a 0.1 M HCl

Vreme, h	c / mM	ln c	1/c
0	0,172523	–1,75722	5,796329
0,25	0,154454	–1,86786	6,47442
1	0,139529	–1,96948	7,166969
2	0,135062	–2,00202	7,404007
24	0,101241	–2,29025	9,877421
Koeficijent korelacije (r)	0,8665	0,8228	0,9391

Tabela 4. Kinetika degradacije olopatadin-hidrohlorida nakon izlaganja 0,01 M HCl

Table 4. Degradation kinetics of the olopatadine hydrochloride degradation after exposure to a 0.01 M HCl

Vreme, h	c / mM	ln c	1/c
0	0,252369	–1,37054	3,977488
0,25	0,250506	–1,38427	3,991920
1	0,248151	–1,39372	4,029804
2	0,242071	–1,41852	4,131019
24	0,240298	–1,42587	4,161499
48	0,240097	–1,42671	4,164983
Koeficijent korelacije (r)	0,7172	0,7200	0,7228

Tabela 5. Kinetika degradacije olopatadin-hidrohlorida nakon izlaganja 30% H₂O₂

Table 5. Degradation kinetics of the olopatadine hydrochloride degradation after exposure to a 30% H₂O₂

Vreme, h	c / mM	ln c	1/c
0	0,293641	–1,2254	3,405519
0,25	0,28956	–1,23939	3,453516
1	0,284596	–1,25668	3,513753
2	0,27875	–1,27744	3,587443
3	0,277757	–1,28101	3,600269
24	0,277426	–1,2822	3,604565
48	0,271469	–1,30391	3,683662
Koeficijent korelacije (r)	0,7287	0,7351	0,7415

Na osnovu dobijenih poluvremena reakcije, zaključeno je da je degradacija u kiseloj sredini sa 0,1 M HCl najbrža reakcija ($t_{1/2} = 41,4$ h), dok je degradacija u baznoj sredini najsporija reakcija ($t_{1/2} = 1572$ h). Na ovaj

Tabela 6. Vrednosti konstanti brzina degradacije i poluvremena degradacije; $[A_0]$ – početna koncentracija
 Table 6. The values of degradation rate constants and half-lives

Parametar	1 M NaOH	0,1 M HCl	0,01 M HCl	30% H ₂ O ₂
Konstanta brzine degradacije, $k / \text{mM}^{-1} \text{h}^{-1}$	0,0022	0,1399	0,0035	0,0039
Poluvreme degradacije $t_{1/2} = 1/k[A_0]$ (h)	1572	41,4	1132.1	873,2

način, potvrđena je velika stabilnost olopatadin-hidrohlorida u baznoj sredini. S druge strane, olopatadin-hidrohlord najosetljiviji je na prisustvo kiseline 0,1 M HCl. Kisela degradacija sa jačom kiselinom 0,1 M HCl znatno je brža reakcija od kisele degradacije sa slabijom kiselinom 0,01 M HCl. Takođe, hidroliza u kiseloj sredini sa 0,1 M HCl značajno je brža reakcija i od reakcije oksidacije u prisustvu 30% H₂O₂, odnosno analit je znatno stabilniji na oksidaciju nego na prisustvo kiseline.

ZAKLJUČAK

U ovom radu opisano je praćenje degradacije olopatadin-hidrohlorida pod uticajem različitih stres agenasa HILIC metodom. Na osnovu navedenih ispitivanja i dobijenih rezultata, pokazano je da je olopatadin-hidrohlord stabilan u baznoj sredini tj da tretiranje sa 1 M natrijum-hidroksidom u trajanju od 48 h daje degradaciju od svega 3,55%. Takođe, studije forsirane degradacije potvrdile su da je olopatadin-hidrohlord stabilan na temperaturi od 60 °C, kao i pod dejstvom nižih koncentracija oksidacionog sredstva dok se pri visokim (30% vodonik-peroksida) razlaže za 7,55% ako je izložen 48 h. Nasuprot tome, olopatadin-hidrohlord je nestabilan pod dejstvom kiseline (više od 60 %za 24 h sa 0,1 M HCl). Pokazano je da se HILIC metodom uspešno može pratiti degradacija olopatadin-hidrohlorida. Takođe, određena je kinetika degradacije idobijeno je da su kisela, bazna i oksidativna degradacija reakcije drugog reda. Na osnovu izračunatih poluvremena degradacije zaključeno je da je kisela degradacija najbrža reakcija, dok je bazna degradacija najsporija reakcija. Takođe, definisanje parametara kinetike reakcije pruža dragocene informacije o njegovom degradacionom profilu i omogućava predviđanje mehanizma degradacije. Ovakvo ponašanje olopatadin-hidrohlorida pruža mogućnost za dodatna i opsežnija ispitivanja njegove stabilnosti, kao i identifikaciju degradacionih proizvoda i puteva degradacije.

Zahvalnica

Ovaj rad je u okviru naučnog projekta 172052 koji finansira Ministarstvo za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

LITERATURA

- [1] S. Singh, M. Junwal, G. Modhe, H. Tiwari, M. Kurmi, N. Parashar, P. Sidduri, Forced degradation studies to

assess the stability of drugs and products, Trends. Anal. Chem. **49** (2013) 71–88.

- [2] K.M. Alsante, A. Ando, R. Brown, J. Ensing, T.D. Hatajik, W. Kong, Y. Tsuda, The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products, Adv. Drug Del. Rev. **59** (2007) 29–37.
- [3] D.W. Reynolds, K.L. Facchine, J.F. Mullaney, K.M. Alsante, T.D. Hatajik, M.G. Motto, Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies, Pharm. Technol. (2002) 48–56.
- [4] S.W. Baertschi, K.M. Alsante, R.A. Reed, Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation, 2nd ed., CRC Press, Taylor & Francis Group, 2011.
- [5] M. Bakshi, S. Singh, Development of validated stability-indicating assay methods-critical review, J. Pharm. Biomed. Anal. **28** (2002) 1011–1040.
- [6] S.P. Bhardwaj, S. Singh, Study of forced degradation behavior of enalapril maleate by LC and LC-MS and development of a validated stability-indicating assay method, J. Pharm. Biomed. Anal. **46** (2008) 113–120.
- [7] M. Bakshi, S. Singh, ICH guidance in practice: establishment of inherent stability of secnidazole and development of a validated stability-indicating high-performance liquid chromatographic assay method, J. Pharm. Biomed. Anal. **36** (2004) 769–775.
- [8] R. Maggio, S.E. Vignaduzzo, T.S. Kaufman, Practical and regulatory considerations for stability-indicating methods for the assay of bulk drugs and drug formulations, Trends, Anal. Chem. **49** (2013) 57–70.
- [9] ICH Harmonized Tripartite Guideline, Stability Testing of New Drug Substances and Drug Products, ICH Q1A (R2), Geneva, 2003.
- [10] ICH Harmonized Tripartite Guideline, Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products, ICH Q1B, Geneva, 1996.
- [11] K. Huynh-Ba, Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development, Springer Science, New York, 2009.
- [12] J. Maksić, M. Jovanović, T. Rakić, I. Popović, D. Ivanović, B. Jančić Stojanović, Chromatographic analysis of olopatadine in hydrophilic interaction liquid chromatography, J. Chromatogr. Sci. **53** (2014) 680–686.
- [13] R.M. Bianchini, P.M. Castellano, T.S. Kautman, Validated stability-indicating HPLC method for the determination of pridinol mesylate. Kinetics study of its degradation in acid medium, J. Pharm. Biomed. Anal. **48** (2008) 1151–1160.
- [14] J. Espenson, Chemical Kinetics and Reaction Mechanism, 2nd ed., McGraw-Hill Companies, 2002.
- [15] H.P. Rang, M.M. Dale, J.M. Ritter, P.K. Moore, Farmakologija, peto izdanje, prvo srpsko izdanje, Data Status, Beograd, 2005.

- [16] The United States Pharmacopeia and The National Formulary (USP35/NF30), Rockville, MD, USA, 2012.
- [17] S. Dey, Y.V. Reddy, B. Swetha, S.D. Kumar, P.N. Murthy, S.K. Sahoo, D. Kumar, S.S. Patro, S. Mohapatra, Method development and validation for the estimation of olopatadine in bulk and pharmaceutical dosage forms and its stress degradation studies using UV-VIS spectrophotometric method, *Inter. J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **2** (2010) 212–218.
- [18] R.V. Rele, C.B. Warkar, Application of high performance liquid chromatographic technique for olopatadine hydrochloride and its impurity in ophthalmic solution, *Int. J. Chem. Sci.* **2** (2011) 601–614.
- [19] M.M. Annapurta, G.H. Bindu, I. Divya, Derivative spectrophotometric method for the determination of olopatadine in pharmaceutical dosage form, *Drug Invent. Today* **10** (2012) 540–542.
- [20] S.J. Varghese, A. Kumar, A. Manikanta, T.K. Ravi, Stability-indicating high-performance column liquid chromatography and high performance thin-layer chromatography for the determination of olopatadine hydrochloride in tablet dosage form, *J. AOAC Int.* **94** (2011) 1815–1820.
- [21] A. Mahajan, P.S. Gandhi, N. Pandita, S.V. Gandhi, P.B. Deshpande, Validated high performance thin layer chromatographic method for estimation of olopatadine hydrochloride as bulk drug and in ophthalmic solutions, *Int. J. Chem. Tech. Res.* **3** (2010) 1372–1375.
- [22] P.D. Bhatt, J. Akhtar, Development and validation of stability-indicating RP-HPLC method for estimation of olopatadine hydrochloride in bulk drug and its formulations, *Int J. Pharmaceut. Sci. Rev. Res.* **2** (2011) 153–158.
- [23] A.A. Mahajan, K. Mohanraj, S. Kale, A.K. Thaker, Study of olopatadine hydrochloride under ICH recommended stress conditions by LC, LC-MS/TOF for identification, and characterization of degradation products, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* **13** (2013) 1881–1898.
- [24] I.M. Jurkić, M. Buratović, I. Valentić, D. Stanfel, UHPLC study of the degradation profiles of olopatadine hydrochloride in eye drops subjected to heat and filtration method of sterilisation, *Chromatographia* **77** (2014) 1067–1080.
- [25] K. Fujita, H. Magara, H. Kobayashi, Determination of olopatadine, a new antiallergic agent, and its metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography with electro spray ionization tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.* **731** (1999) 345–352.
- [26] P. Zhu, Y.G. Wen, X.P. Fan, Z.L. Zhou, R.X. Fan, J.M. Chen, K.L. Huang, X.L. Zhu, Y.F. Chen, J. Zguang, A rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of olopatadine concentration in human plasma, *J. Anal. Technol.* **35** (2011) 113–118.
- [27] B. Buszowski, S. Noga, Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique, *Anal. Bioanal. Chem.* **402** (2012) 231–247.
- [28] A.J. Alpert, Hydrophilic interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds, *J. Chromatogr.* **499** (1990) 177–196.
- [29] D.V. McCalley, Study of the selectivity, retention mechanisms and performance of alternative silica-based stationary phases for separation of ionised solutes in hydrophilic interaction chromatography, *J. Chromatogr., A* **1217** (2010) 3408–3417.
- [30] A.C. Kenneth, Chemical kinetics: the study of reaction rates in solution, 1st ed., John Wiley & Sons, 1990.
- [31] E. Soury, A.A. Negahban, N. Adib, A stability indicating HPLC method for determination of mebeverine in the presence of its degradation products and kinetic study of its degradation in oxidative conditions, *Res. Pharm. Sci.* **9** (2014) 199–206.
- [32] M.A. Korany, R.S. Haggag, M.A.A. Ragab, O.A. Elmallah, Kinetic investigation of pentoxifylline based on nonparametric linear regression of derivative and convoluted derivative chromatographic and spectrophotometric responses, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* **37** (2014) 475–497.
- [33] U. Hubicka, B.W. Zumorska, D. Knapczyk, J. Krzek, Determination of danofloxacin and its photodegradation products by thin-layer chromatography: Kinetic evaluation of degradation process, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* **37** (2014) 2915–2928.
- [34] H. Alaani, Y. Alnukkary, I. Alashkar, Stability and kinetic studies for the estimation of shelf life of chloramphenicol, dexamethasone sodium phosphate, and tetrahydrozoline hydrochloride ophthalmic solution, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **30** (2015) 327–330.
- [35] A.H. Akarabi, D.R. Shah, S.A. Shah, B.N. Suhagia, Kinetic degradations of pitavastatin calcium by stability indicating HPTLC method, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* **38** (2015) 521–531.

SUMMARY**INVESTIGATION OF OLOPATADINE HYDROCHLORIDE UNDER STRESS CONDITIONS BY HYDROPHILIC INTERACTION LIQUID CHROMATOGRAPHY**

Jelena Đ. Maksić¹, Anja R. Tumpa², Igor B. Popović³ Biljana S. Jančić-Stojanović²

¹*Military Medical Academy, Sector for Pharmacy, Department of Drug Control and Examination, Crnotravska 17, Belgrade, Serbia*

²*University of Belgrade, Faculty of Pharmacy, Department of Drug Analysis, Vojvode Stepe 450, Belgrade, Serbia*

³*Medicines and Medical Devices Agency of Serbia, Vojvode Stepe 458, Belgrade, Serbia*

(Scientific paper)

The purpose of the present research was to conduct stress degradation studies on the olopatadine hydrochloride, an antiallergic drug, using the hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC). HILIC requires the utilization of polar and moderately polar stationary phases and aqueous-organic mobile phase usually containing more than 70% of organic solvent. In this study, olopatadine hydrochloride was subjected to acid and base hydrolysis, oxidation and thermolytic degradation in order to estimate its stability under different *stress* conditions recommended by ICHQ1A (R2) guideline. Degree of degradation was followed by HILIC method. The chromatographic conditions were: column Betasil Cyano (100 mm×4.6 mm, 5 μm particle size), mobile phase consisted of acetonitrile and ammonium acetate 5 mM (pH adjusted to 4.50) in ratio 85:15 V/V, flow rate was 1 mL min⁻¹, column temperature was set at 30 °C and detection was performed at 257 nm. Results obtained for *stress* studies indicated that olopatadine hydrochloride underwent transformation under acidic and oxidative (30% hydrogen peroxyde) conditions showing high degree of degradation. Furthermore, it was found that olopatadine hydrochloride is relatively stable when exposed to thermal (60 °C) and basic (1 M NaOH) conditions. Therewith, kinetics of degradation reaction was determined with an aim to define the corresponding reaction rate constants and half-lives. Firstly, the order of the reaction was evaluated experimentally using the integral method. Based on the calculated values of the correlation coefficients, it was shown that the acidic, basic and oxidative degradation are the second-order reaction. High stability under basic conditions was achieved on the basis of the great degradation half-life values. Also, it has been verified that acidic degradation is the fastest reaction.

Keywords: Olopatadine hydrochloride • Forced degradation studies • Degradation kinetics • Hydrophilic interaction liquid chromatography